

UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in  
Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di Laurea

CROSS-TALK TRA SOLFURO DI IDROGENO ED OSSIDO  
D'AZOTO NEL DISTRETTO CORONARICO IN CONDIZIONI  
NORMALI E DI IPERTENSIONE

Relatori:

Dott. Vincenzo Calderone

Dott.ssa Lara Testai

Candidato:

David Ferrara

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

## INDICE:

1. Introduzione	4
1.1. Biosintesi e catabolismo dell'H <sub>2</sub> S nell'organismo	6
1.2. Ruolo dell'H <sub>2</sub> S nel sistema cardiovascolare	8
1.2.1. Funzione cardioprotettiva	8
1.2.2. Effetti a livello vascolare	9
1.2.3. Meccanismi d'azione e cross-talk con ossido nitrico	11
1.2.4. Ruolo biologico a livello coronarico	20
2. Scopo della ricerca	23
3. Materiali e metodi	25
3.1. Animali	25
3.2. Allestimento	25
3.3. Valutazione del flusso coronarico	27
3.4. Sostanze utilizzate	27
3.5. Protocolli sperimentali	28
3.6. Analisi dei dati	30

4. Risultati e discussione	31
4.1. Coinvolgimento di NO endogeno negli effetti vascolari di NaHS sulle arterie coronarie di ratti normotesi	31
4.2. Coinvolgimento di NO endogeno negli effetti vascolari di NaHS sulle arterie coronarie di ratti ipertesi	34
4.3. Coinvolgimento di H <sub>2</sub> S endogeno negli effetti vascolari di SNP sulle arterie coronarie di ratti normotesi	39
4.4. Coinvolgimento di H <sub>2</sub> S endogeno negli effetti vascolari di SNP sulle arterie coronarie di ratti ipertesi	42
4.5. Discussione	46
4.6. Conclusioni	50
5. Bibliografia	52
6. Ringraziamenti	64

## 1. Introduzione.

In questi ultimi decenni, i “gas trasmettitori” come l’ossido nitrico (NO), il monossido di carbonio (CO) e il solfuro di idrogeno (H<sub>2</sub>S) sono stati oggetto di studi finalizzati a valutarne il ruolo fisiologico e farmacologico (Olson et Donald, 2009). In particolare, le attenzioni si sono focalizzate prima su NO e, negli ultimi anni, sull’H<sub>2</sub>S che è sembrato essere il futuro candidato di questa classe di composti (Abe et Kimura, 1996).

In passato, i “gas trasmettitori” erano visti solo come agenti ad elevato potenziale tossico. Infatti se assunti ad alte concentrazioni possono causare i seguenti effetti:

- CO si lega saldamente all’emoglobina, impedendone la combinazione con l’ossigeno, causando asfissia e potenziali esiti letali (Prockop et Chichkova, 2007);
- NO produce metaboliti dannosi a livello cardiovascolare e del sistema nervoso (Ponderoso et al., 1996; Calabrese et al., 2007);
- H<sub>2</sub>S compromette la respirazione mitocondriale e può essere coinvolto in condizioni patologiche quali

l'infiammazione, l'ictus e la sepsi (Lowicka et Beltowski, 2007).

A concentrazioni fisiologiche, invece, queste sostanze, ed in particolare l'H<sub>2</sub>S, giocano un ruolo importante nella regolazione di alcune funzioni, provocando vasodilatazione, promuovendo l'angiogenesi ed esercitando un ruolo chiave nella cardioprotezione (Li et al., 2009).

Recentemente è stato scoperto che i "gas trasmettitori" sono sostanze endogene prodotte nei tessuti dei mammiferi. Diversi studi hanno infatti accertato che la concentrazione plasmatica di H<sub>2</sub>S nell'uomo e nei roditori è compresa in un range da 20 a 100 µM (Brancaleone et al., 2008; Mok et al., 2004). Il range appena descritto tiene conto sia della biosintesi sia del catabolismo a cui questo gas va incontro.

L'H<sub>2</sub>S è caratterizzato dalla capacità di attraversare le membrane biologiche senza l'utilizzo di uno specifico trasportatore. Questo è permesso grazie ad un'elevata lipofilicità che gli permette di attraversare tutte le membrane e di penetrare in tutti i tipi di cellule, proprietà che gli conferisce un alto potenziale biologico (Li et Moore, 2008).

Contrariamente all'NO, l'H<sub>2</sub>S non porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma risulta essere piuttosto uno "scavenger" dei ROS (Whiteman et al., 2004; Whiteman et al., 2005).

### 1.1. Biosintesi e catabolismo dell'H<sub>2</sub>S nell'organismo.

La produzione endogena dell'H<sub>2</sub>S avviene nei tessuti dei mammiferi attraverso vie enzimatiche e non-enzimatiche, quest'ultime meno rilevanti. Il processo non-enzimatico procede attraverso la riduzione di zolfo usando equivalenti di riduzione ottenuti dall'ossidazione del glucosio. In tale processo entrano in gioco altri substrati come il NADH, NADPH ed il glutathione (Martelli et al., 2012). Per quanto riguarda la via enzimatica, l'H<sub>2</sub>S viene sintetizzato ad opera di due enzimi: la cistationina β-sintetasi (CBS) e la cistationina γ-liasi (CSE), entrambi piridossale-5'-fosfato dipendenti (Vit. B<sub>6</sub>) (Chen et al., 2004). CBS e CSE non sono distribuite in modo omogeneo in tutti i tessuti dei mammiferi: in particolare la CBS è presente nel sistema nervoso centrale (Robert et al., 2003), mentre la CSE è localizzata nel sistema cardiovascolare, più precisamente a livello del tessuto endoteliale di rivestimento dei vasi mentre scarsamente nella muscolatura liscia vascolare. La

delezione genetica di CSE in alcuni tipi di ratti (SHR normalmente ipertesi) porta ad una riduzione dei livelli di  $H_2S$  nel sangue, con lo sviluppo di una ipertensione patologica marcata (Yang et al., 2008).

Il catabolismo dell' $H_2S$ , favorito dalle caratteristiche riducenti della sostanza, è mediato da vari agenti ossidanti circolanti (Geng et al., 2004; Whiteman et al., 2004; Whiteman et al., 2005; Chang et al., 2008). Tuttavia la distruzione metabolica avviene principalmente a livello mitocondriale, dove il solfuro si ossida a tiosolfato, attraverso una via non-enzimatica (Martelli et al., 2012). A questo punto, per opera dell'enzima rodanasi, il tiosolfato viene biotrasformato a solfito. Quest'ultimo viene ossidato a solfato inorganico dall'enzima solfito ossidasi (Goubern et al., 2007; Hildebrandt et Grieshaber, 2008).

Il catabolismo dell' $H_2S$  avviene, in piccola parte, anche a livello del citosol cellulare e del sangue. Nel primo caso, ad opera dell'enzima tiolo S-metiltransferasi, viene metilato formando il metantiolo (Furne et al., 2001); nel secondo caso, l' $H_2S$  reagisce con la metaemoglobina per formare la solfoemoglobina, utilizzata come biomarker per risalire alle concentrazioni plasmatiche di  $H_2S$  (Kurzban et al., 1999).

### 1.2. Ruolo dell'H<sub>2</sub>S nel sistema cardiovascolare.

La somministrazione di H<sub>2</sub>S provoca, nel ratto, una risposta rilasciante concentrazione-dipendente a livello della muscolatura liscia vascolare (Hosoki et al., 1997). Tale sostanza esplica la propria azione sia a livello dei grandi vasi, come aorta toracica e vena porta, sia a livello di vasi periferici di resistenza. L'H<sub>2</sub>S gioca, quindi, un ruolo fondamentale nella regolazione delle resistenze vascolari e nell'omeostasi della pressione sanguigna (Bucci et Cirino, 2011).

1.2.1. *Funzione cardioprotettiva.* Recenti studi hanno dimostrato che l'H<sub>2</sub>S esercita un'azione cardioprotettiva grazie all'apertura dei canali del potassio ATP-dipendenti (K<sub>ATP</sub>) nei cardiomiociti (Zhang et al., 2007, Zhong et al., 2010). La somministrazione esogena di H<sub>2</sub>S nei ratti attenua la gravità e la durata delle aritmie indotte dal danno da ischemia/riperfusione sia in vivo che in vitro (Sivarajah et al., 2009; Bian et al., 2006). Nella patogenesi del danno da ischemia/riperfusione, la risposta infiammatoria endogena ed il rilascio di ROS sono considerate le principali cause dell'induzione del danno miocardico (Roberts et al., 1990); in concomitanza, i leucociti neutrofili, attivati a seguito della riperfusione cardiaca, rilasciano mediatori pro-



infiammatori all'interno della regione ischemica (Kloner et al., 1991). L'effetto cardioprotettivo dell' $\text{H}_2\text{S}$  è stato confermato anche da esperimenti condotti su allestimenti di cuore alla Langendorff pretrattati con Propargilglicina (PAG), uno specifico inibitore della CSE. Dopo 40 minuti di ischemia indotta, è stato rilevato un aumento del 40%, rispetto al controllo, della zona miocardica colpita da infarto (Bliksoen et al., 2008). Questi dati indicano che l' $\text{H}_2\text{S}$  endogeno è essenziale per la protezione del miocardio dal danno da ischemia/riperfusione.

1.2.2. *Effetti a livello vascolare.* L' $\text{H}_2\text{S}$ , considerato a lungo unicamente come gas tossico, è un importante modulatore endogeno che agisce direttamente sulla muscolatura liscia vascolare causando effetti concentrazione-dipendenti. L'attività vasodilatatoria si presenta sia sui grossi vasi, come dimostrato da vari studi svolti su anelli isolati di aorta di ratto (Martelli et al., 2013), sia sui piccoli vasi di resistenza. È proprio a questo livello che viene garantito il maggior effetto di regolazione sulla pressione sanguigna (Cheng et al., 2004).

La funzione vasomotoria dell' $\text{H}_2\text{S}$  è mimata dalla L-Cisteina, abolita a sua volta dagli inibitori della CSE (PAG),

dimostrando che l'amminoacido in questione opera da fonte endogena di  $H_2S$ . La delezione genetica della CSE nei topi causa un abbassamento dei livelli di  $H_2S$  nel sangue, un aumento della pressione sanguigna ed una diminuzione dell'effetto vasorilasciante mediato dall'endotelio (Yang et al., 2008). Il rilascio dato dall' $H_2S$  è dovuto principalmente all'apertura dei canali  $K_{ATP}$  a livello delle cellule della muscolatura liscia vasale. Studi elettrofisiologici hanno dimostrato che il gas trasmettitore induce correnti di  $K^+$  ATP-dipendenti, causando iperpolarizzazione della membrana delle cellule isolate di muscolatura liscia vascolare (Cheng et al., 2004; Tang et al., 2005). Infatti, un pretrattamento con glibenclamide (inibitore dei canali  $K_{ATP}$ ) riduce l'attività ipotensiva in vivo e l'effetto vasodilatatore in vitro dell' $H_2S$  esogeno (Zhao et al., 2001).

L'espressione della CSE e la sua attività vengono inibite nei ratti spontaneamente ipertesi (SHR). In più, la somministrazione cronica di idrosolfuro di sodio (NaHS), donatore esogeno di  $H_2S$ , abbassa la pressione sanguigna nei ratti SHR ma non nei normotesi. La somministrazione continua di inibitori della CSE riduce le concentrazioni plasmatiche di  $H_2S$  solo nei ratti normotesi, dimostrando che il gas trasmettitore ha un ruolo rilevante nella regolazione del

tono vascolare e che la sua alterazione è associata con lo sviluppo dell'ipertensione (Yan et al., 2004).

Ratti con ipertensione indotta farmacologicamente tramite l'utilizzo di NOS-inibitori (come L-NAME) hanno mostrato una disfunzione della sintesi e del pathway dell'H<sub>2</sub>S a causa dell'inibizione della CSE; la somministrazione di NaHS ha portato ad una significativa diminuzione dei valori di pressione arteriosa. Questo dimostra che la sintesi ed il pathway dell'H<sub>2</sub>S sono profondamente coinvolti nella regolazione della pressione sanguigna e che fonti esogene di questa sostanza possono effettivamente prevenire lo sviluppo di ipertensione (Zhong et al., 2003).

1.2.3. *Meccanismi d'azione e cross-talk con ossido nitrico.* L'H<sub>2</sub>S agisce attraverso specifici target farmacologici; in particolare, uno dei primari meccanismi che mediano gli effetti vasodilatatori del gas trasmettitore è l'attivazione di canali K<sub>ATP</sub> (Zhao et al., 2001). Questi canali sono largamente distribuiti in vari distretti del corpo ed esercitano un ruolo fondamentale nella regolazione di funzioni biologiche in molti tessuti e sistemi, come cellule  $\beta$  pancreatiche, neuroni, cellule di muscolatura liscia scheletrica e miocardica (Ashcroft et Ashcroft, 1990).

I canali  $K_{ATP}$  collegano lo stato metabolico delle cellule con la loro eccitabilità (Nichols, 2006), perché i livelli intracellulari di ATP e ADP sono fattori chiave che determinano rispettivamente l'inibizione o l'attivazione dei canali: in condizioni di metabolismo energetico positivo, gli alti livelli di ATP inibiscono l'attività dei canali; mentre in condizioni di metabolismo energetico ridotto, l'aumento di ADP e la diminuzione del rapporto ATP/ADP attivano i canali che garantiscono una corrente verso l'esterno di ioni potassio tale da causare una iperpolarizzazione della membrana. Questo peculiare meccanismo di attivazione/inibizione metabolismo-dipendente rende i canali  $K_{ATP}$  fattori determinanti nella regolazione di molte funzioni biologiche, inclusa la regolazione dell'attività cardiaca. L'interazione molecolare tra  $H_2S$  ed i canali  $K_{ATP}$  è ancora sconosciuta. Alla luce del meccanismo di attivazione/inibizione precedentemente descritto, è possibile ipotizzare che l'attivazione dei canali  $K_{ATP}$  indotta da  $H_2S$  possa essere dovuta dall'abilità del gas trasmettitore di causare un'inibizione metabolica con conseguente diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP. In linea con questa ipotesi, è stato riportato da studi effettuati da Kiss e colleghi che l' $H_2S$  fa diminuire il livello di ATP in anelli di aorta e l'effetto di

vasodilatazione  $H_2S$ -mediato è associato con gli effetti metabolici (Kiss et al., 2008). Recenti studi, basati su esperimenti di mutazione puntiforme sito-specifici, hanno fornito una prima dimostrazione di un possibile effetto diretto; in particolare, i canali  $K_{ATP}$  sono formati dalla co-espressione di due sub-unità: la proteina Kir6 (come Kir6.1 o Kir6.2) che forma il poro transmembrana ed una sub-unità SUR (recettore delle sulfaniluree) come SUR1, SUR2A o SUR2B. Attraverso l'espressione eterologa delle sub-unità Kir6.1 e SUR1 nella linea cellulare HEK-293, è stato dimostrato che l'attivazione dei canali  $K_{ATP}$   $H_2S$ -indotta richiede obbligatoriamente l'espressione delle due sub-unità sopracitate. In conclusione, sembra che il sito di interazione di  $H_2S$  all'interno dei canali  $K_{ATP}$  sia localizzato nella sub-unità SUR (Jiang et al., 2010). L'importanza dei canali  $K_{ATP}$  è stata ampiamente dimostrata tramite la somministrazione di glibenclamide su anelli di aorta. Questa solfanilurea riduce significativamente l'effetto vasorilasciante di NaHS, ma non lo elimina totalmente (Zhao et Wang, 2002). Questo suggerisce che l'effetto dell' $H_2S$  viene esplicato anche tramite vie differenti.

Sulla base di studi funzionali, è stato recentemente ipotizzato che l'H<sub>2</sub>S agisce come fattore di rilascio endogeno adipocita-derivato (ADRF), liberato dai tessuti adiposi perivascolari grazie all'attivazione di canali del potassio K<sub>v</sub>7 voltaggio-dipendenti (Schleifenbaum et al., 2010; Köhn et al., 2012). Infatti, è stato scoperto che l'ADRF evoca il rilascio di aorta ed arteria mesenterica di roditore pretrattate con agente contratturante, effetto antagonizzato non solo da inibitori della CSE, ma anche da bloccanti dei K<sub>v</sub>7 (come XE 991). I canali K<sub>v</sub>7 giocano un ruolo fondamentale nella stabilizzazione del potenziale di membrana a valori di riposo, contrastando in questo modo l'eccitabilità elettrica in molti tipi di cellule (Robbins, 2001). Attualmente sono stati riconosciuti cinque sottotipi di K<sub>v</sub>7 (K<sub>v</sub>7.1-K<sub>v</sub>7.5), ognuno dei quali è distribuito in un diverso tessuto dell'organismo (Soldovieri et al., 2011). La presenza dei canali K<sub>v</sub>7 nelle cellule della muscolatura liscia vascolare è stata recentemente dimostrata, dove agiscono da "freno sottosoglia": questi canali, infatti, sono attivati a circa -60 mV e fanno in modo da mantenere il potenziale di membrana di riposo lontano dalla soglia dell'attivazione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti (attivati a circa -40 mV), prevenendo così la vasocostrizione (Ohya et al., 2003;

Mackie et al., 2008; Mani et Byron, 2011). Tra tutti i sottotipi di recettori  $K_v7$ , il  $K_v7.4$  è quello che presenta una maggiore espressione a livello della muscolatura liscia vascolare; anche i  $K_v7.1$ ,  $K_v7.3$  e  $K_v7.5$  hanno un'espressione variabile, l'unico totalmente assente sembrerebbe il  $K_v7.2$  (Ng et al., 2011).

Per confermare queste ipotesi, Martelli e colleghi hanno testato una serie di sostanze bloccanti i canali del potassio su anelli di aorta di ratto, sottoposti precedentemente all'attività vasorilasciante di NaHS. Da queste analisi è emerso che i canali  $K_v7$ , e più in particolare le sub-unità  $K_v7.4$ , sono importanti target farmacologici per l' $H_2S$  e che l'attivazione di questa classe di canali ionici recita una parte fondamentale nella risposta vasorilasciante mediata dal gas trasmettitore (Martelli et al., 2013).

Come già detto in precedenza, l'ossido nitrico ed il solfuro di idrogeno sono due gas trasmettitori endogeni i cui ruoli all'interno del sistema cardiovascolare includono la vasodilatazione e la stimolazione dell'angiogenesi. Da studi recenti si è ipotizzato che esista un cross-talk tra  $H_2S$  e la via L-arginina/NOS/NO ed un cross-talk tra NO e la via L-cisteina/CSE/ $H_2S$ . Nelle cellule endoteliali, l'NO è

sintetizzato dalla isoforma endoteliale dell'NO-sintetasi (eNOS). Il principale pathway dell'NO comporta la formazione di un legame con la frazione eme della guanilato ciclasi solubile (sGC) e la produzione del secondo messaggero guanosina 5'-monofosfato ciclico (cGMP), seguita dall'attivazione della proteina chinasi G (PKG) (Ignarro, 1999; Bryan et al., 2009). L'H<sub>2</sub>S vascolare è prodotto dalla L-cisteina tramite gli enzimi CBS e CSE; in più, è stato mostrato che la stimolazione muscarinica porta all'attivazione della CSE a livello endoteliale, innescando la conversione dell'L-cisteina in H<sub>2</sub>S. Quindi, nelle pareti dei vasi del sistema vascolare, queste due vie coesistono e svolgono una funzione analoga. Topi CSE knockout manifestano ipertensione allo stesso modo di topi eNOS knockout (Yang et al., 2008). Inoltre, arterie di resistenza isolate da topi CSE knockout hanno mostrato una marcata inibizione alla reazione rilasciante indotta da metacolina. Sebbene la vasodilatazione indotta dall'H<sub>2</sub>S possa essere ottenuta tramite effetti diretti endotelio-indipendenti sulle cellule di muscolatura liscia (Zhao et al., 2001), è stato visto che l'utilizzo di inibitori dell'NO-sintetasi o la rimozione dell'endotelio possono attenuare il rilascio indotto dall'H<sub>2</sub>S. Queste osservazioni, insieme ai dati riportati in letteratura mostranti effetti simili per i due gas



trasmettitori, suggeriscono che NO e H<sub>2</sub>S cooperano dinamicamente per mantenere una omeostasi vasale e si servono l'uno dell'altro per sopperire a condizioni patologiche (Sanderson, 2009; Li et al., 2009).

Recentemente, con la tecnica del siRNA, è stato visto che l'H<sub>2</sub>S a livello vasale è un inibitore endogeno non selettivo della fosfodiesterasi (PDE) e ciò porta ad un aumento dei livelli di cGMP. Somministrando, infatti, H<sub>2</sub>S esogeno si osserva un aumento nel tempo di cGMP in modo concentrazione-dipendente (Bucci et al., 2010). Al momento ci sono due ipotesi che spiegano il meccanismo con il quale l'H<sub>2</sub>S blocca l'attività della PDE: la prima ipotesi prende in considerazione lo zinco presente nella struttura della PDE. Lo Zn è coordinato con residui di istidina ed acido aspartico nella tasca di legame e la sua traslocazione abolisce l'attività della PDE. Dunque, il legame dell'H<sub>2</sub>S con lo Zn della fosfodiesterasi porta ad una inibizione dell'enzima (Szabo, 2007). Inoltre, è stato osservato che l'H<sub>2</sub>S è in grado di inibire l'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE) nelle cellule endoteliali tramite l'interferenza con lo Zn presente nel sito attivo dell'enzima stesso (Laggner et al., 2007). Nella seconda ipotesi si prende in considerazione il risultato ottenuto dall'analisi di spettrometria di massa. Da questo

esperimento si è visto che l' $\text{H}_2\text{S}$  attacca uno zolfo ai gruppi -SH della cisteina presenti nell'enzima PDE, portando alla formazione di gruppi -SSH (Mustafa et al., 2009). Questa modifica a livello dei residui di cisteina porta ad una riduzione dell'attività delle PDE. Dai dati sperimentali emerge che l' $\text{H}_2\text{S}$  mostra un effetto di vasodilatazione in quanto porta all'attivazione dei canali  $\text{K}_{\text{ATP}}$  e inoltre bloccando l'attività della PDE, migliora il segnale cGMP/PKG (Bucci et al., 2010). Il PKG attiva i canali del potassio che portano a iperpolarizzazione e a vasorilasciamento (Alioua et al., 1998; Han et al., 2002). Detto in altri termini, l' $\text{H}_2\text{S}$ , inibendo l'attività della PDE, porta ad un aumento dei livelli di cGMP, attivando così la PKG che a sua volta agisce sui canali del potassio con conseguente iperpolarizzazione e rilasciamento.

L'esposizione delle cellule endoteliali ad  $\text{H}_2\text{S}$  aumenta i livelli intracellulari di guanosina 5'-monofosfato ciclico (cGMP) in modo NO-dipendente, attiva la proteina chinasi G (PKG) ed il suo effettore a valle, la fosfoproteina vasodilatatore-stimolata (VASP). L'inibizione dell'isoforma endoteliale dell'NO-sintetasi (eNOS) o della PKG-I abolisce la risposta angiogenica stimolata dall' $\text{H}_2\text{S}$ , attenuandone la risposta vasodilatatoria e dimostrando la necessità di NO nel pathway  $\text{H}_2\text{S}$  vascolare. Viceversa, bloccando l'enzima

CBS, viene abolito l'accumulo di cGMP NO-stimolato; l'angiogenesi e la vasodilatazione indotta da acetilcolina vengono attenuate, indicando un bisogno parziale di H<sub>2</sub>S nell'attività vascolare dell'NO. Anche se è generalmente accettato che NO e H<sub>2</sub>S utilizzino pathway uniche, i risultati attuali dimostrano un inaspettato livello di cooperazione tra queste vie, convergenti al livello delle proteine chinasi G (PKG) per promuovere angiogenesi e vasodilatazione. La dipendenza reciproca di questi due gas trasmettitori è quasi assoluta in caso di angiogenesi, perché bloccando eNOS viene abolito completamente l'effetto angiogenico di H<sub>2</sub>S, mentre l'inibizione di H<sub>2</sub>S riduce notevolmente l'effetto angiogenico di NO (Coletta et al., 2012).

Sebbene negli ultimi anni la comunità scientifica si sia orientata a pensare che esista un cross-talk tra NO e H<sub>2</sub>S, risulta ancora difficile far chiarezza sulla loro interazione. È stato visto che a livello della muscolatura liscia vascolare, in particolare a livello del tessuto aortico di ratto, l'H<sub>2</sub>S è in grado sia di potenziare ma anche di attenuare l'effetto di vasodilatazione dell'NO (Ali et al., 2006). Infatti, è noto che l'H<sub>2</sub>S sia uno scavenger dell'NO, questo perché c'è una interazione chimica tra H<sub>2</sub>S e NO/specie-reattive (Whiteman et al., 2004). Da studi in

vitro si è osservato che l' $\text{H}_2\text{S}$ , reagendo chimicamente con l' $\text{NO}$ , porta alla produzione di una specie tionitrato sconosciuta (Whiteman et al., 2004). L'esistenza del cross-talk è stata anche osservata con l'utilizzo di donatori di  $\text{NO}$ . In particolare, in questi studi è stato utilizzato il sodio nitroprussiato (SNP), il quale porta ad un aumento della produzione endogena di  $\text{H}_2\text{S}$  nel tessuto vascolare di ratto, tramite un incremento dell'espressione di CSE e CBS (Zhao et al., 2003).

1.2.4. *Ruolo biologico a livello coronarico.* L'utilizzo di donatori esogeni dell' $\text{H}_2\text{S}$ , come NaHS, ha mostrato che questo gas trasmettitore esplica una funzione vasorilasciante o vasocostrittrice a seconda del letto vascolare sottoposto a trattamento e della specie animale utilizzata (Dombkowski et al., 2005). L'azione vasorilasciante indotta da  $\text{H}_2\text{S}$  endotelio-dipendente è stata riscontrata nell'arteria mesenterica di ratto (Cheng et al., 2004), ma non sull'aorta di ratto (Zhao et al., 2001). Questo fa pensare che il ruolo svolto dall'endotelio non è uniforme in tutto il sistema circolatorio, ma dipende dal letto vascolare sottoposto a trattamento. Nonostante gli ormai chiari benefici dell' $\text{H}_2\text{S}$  nello svolgere un'azione vasodilatatoria sui vasi sanguigni ed un'azione

cardioprotettiva sul danno miocardico da ischemia, gli effetti del gas trasmettitore e dei suoi donatori esogeni sulla circolazione coronarica non sono ancora molto chiari. Cheang e colleghi hanno dimostrato che l'NaHS esplica un effetto vasodilatatorio sulle arterie coronarie e che questo rilascio è indipendente dalla presenza dell'endotelio e non è influenzato dagli inibitori dei NOS. Non è certo se l'effetto cardioprotettivo dell'H<sub>2</sub>S riscontrato in vivo sia esclusivamente dovuto alla sua azione diretta sui cardiomiociti, oppure se contribuisce anche solo parzialmente l'attività esercitata sul tono delle arterie coronarie. Gli studi effettuati dimostrano comunque che l'effetto dilatatorio dell'NaHS può giocare un ruolo fondamentale nell'incremento della perfusione sanguigna a livello coronarico (Cheang et al., 2010).

Nelle arterie coronarie di ratto, l'attivazione da parte dell'H<sub>2</sub>S dei canali K<sub>ATP</sub> sembra avere un piccolo ruolo nell'effetto riscontrato, poiché l'utilizzo di glibenclamide, a concentrazioni tali da bloccare i canali del potassio ATP-dipendenti, non inibisce l'azione vasorilasciante e l'iperpolarizzazione mediata dall'NaHS (Standen et al., 1989).

L'espressione dei canali del potassio voltaggio-dipendenti ( $K_v$ ) all'interno delle cellule muscolari lisce nelle arterie coronarie di ratto è già stata ampiamente discussa (Liu et al., 2001; Gautier et al., 2007), ma Cheang e colleghi hanno dimostrato per la prima volta che l'attivazione dei canali  $K_v$  4-amminopiridina-dipendenti e la conseguente iperpolarizzazione delle cellule della muscolatura liscia vascolare media parzialmente l'azione rilasciante indotta da NaHS nelle arterie coronarie di ratto (Cheang et al., 2010). Resta ancora da stabilire se l'NaHS possa produrre gli stessi benefici anche in vivo, in modo da contribuire alla funzione di protezione cardiaca.

## 2.Scopo della ricerca.

Le conoscenze scientifiche riguardo il ruolo fisiologico e patologico dell'H<sub>2</sub>S sono ancora frammentarie, infatti, gli studi disponibili non sono univoci, soprattutto quelli finalizzati alla valutazione dei meccanismi d'azione di questo mediatore. In particolare, è stato ipotizzato un cross-talk tra i due più importanti gas trasmettitori del nostro organismo, H<sub>2</sub>S ed NO, ma anche a questo proposito non si conosce ancora il genere dell'interazione; infatti alcuni autori ipotizzano un'azione scavenger di H<sub>2</sub>S verso NO, con conseguente annullamento degli effetti vasoattivi, altri invece ipotizzano un effetto sinergico.

L'attenzione di questa ricerca è stata rivolta alla valutazione degli effetti vasoattivi di H<sub>2</sub>S a livello del distretto coronarico, ancora poco investigato.

Durante questa tesi sono stati valutati gli effetti di NaHS, come donatore esogeno di H<sub>2</sub>S, e di sodio nitroprussiato (SNP), come donatore esogeno di NO, a livello del circolo coronarico tramite analisi del flusso coronarico in ratti normotesi e spontaneamente ipertesi, come modello di disfunzione cardiovascolare. In più è stato valutato il

cross-talk tra  $H_2S$  e la via L-arginina/NOS/NO ed il cross-talk tra NO e la via L-cisteina/CSE/ $H_2S$ , utilizzando specifici bloccanti.



### 3. Materiali e metodi.

#### 3.1. Animali.

Per la sperimentazione sono stati utilizzati ratti albinici di ceppo Wistar-Kyoto normotesi e spontaneamente ipertesi (SHR), di sesso maschile e di peso compreso tra 300 e 400 grammi. I ratti sono stati allevati in gabbie di dimensioni appropriate al peso ed al numero di individui contenuti, con libero accesso ad acqua e cibo, esposti a cicli alternati di luce/buio di 12 ore.

La sperimentazione è stata condotta in conformità alla normativa italiana (D.L. n.116/92) e alla direttiva della Comunità Europea (CEE 86/609).

#### 3.2. Allestimento.

Gli animali sono stati sacrificati tramite dissanguamento ascellare, previa iniezione intraperitoneale di pentobarbitale di sodio (100 mg/kg). Successivamente sono state praticate una stereotomia ed una pericardiotomia, il cuore espantato è stato immerso in un becker contenente soluzione di Krebs carbogenata ( $\text{NaHCO}_3$  25.0 mM, Glucosio 11.7 mM, NaCl 117.9 mM; KCl 4.8 mM  $\text{MgSO}_4$  2.5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.2

mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, pH 7.4; addizionata con 95% di  $\text{O}_2$  e 5% di  $\text{CO}_2$ ), precedentemente portata alla temperatura di  $4^\circ\text{C}$  per indurre una cardioplegia transitoria. L'aorta ascendente è stata incannulata e l'arteria polmonare è stata rapidamente incisa per favorire la fuoriuscita del perfusato dal ventricolo destro, limitando le sofferenze cardiache. Tramite infusione in bolo sono stati somministrati 0.1 ml di eparina calcica onde evitare la formazione di coaguli sanguigni nella circolazione coronarica. Tutte le operazioni precedenti sono state eseguite entro 2 minuti dal dissanguamento dell'animale.

Il cuore è stato perfuso con soluzione salina di Krebs ( $\text{NaHCO}_3$  25.0 mM, Glucosio 11.7 mM,  $\text{NaCl}$  117.9 mM;  $\text{KCl}$  4.8 mM  $\text{MgSO}_4$  2.5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, pH 7.4) satura di carbogeno a pressione e temperatura costanti, rispettivamente 75-80 mmHg e  $37^\circ\text{C}$ .

Per controllare i parametri funzionali del cuore è stato inserito nel ventricolo sinistro, tramite la valvola mitrale, un palloncino in lattice riempito con acqua bidistillata alla pressione di 5-10 mmHg e collegato ad un trasduttore di pressione (Bentley Trantec, mod. 800) connesso a sua volta ad un sistema di acquisizione dati (Byopac, California USA).

### 3.3. Valutazione del flusso coronarico.

Il perfusato, refluo dal circolo coronarico, è stato raccolto e misurato volumetricamente ad intervalli di 5 minuti dall'inizio dell'esperimento. Quindi, per fornire un valore standardizzato, il flusso coronarico è stato espresso in ml/min/g di peso di cuore. In seguito ad ogni trattamento farmacologico, la variazione del flusso coronarico è stata espressa come percentuale in relazione al valore di flusso registrato alla fine del periodo di stabilizzazione dell'organo.

### 3.4. Sostanze utilizzate.

- a. NaHS (*Idrosolfuro di sodio idrato*, Sigma-Aldrich). Le scaglie di NaHS sono state sciolte in acqua bidistillata per ottenere una soluzione madre  $10^{-1}$  M dalla quale sono state effettuate le successive diluizioni in Krebs.
- b. SNP (*Sodio nitroprussiato*, Sigma-Aldrich). I granuli sono stati solubilizzati in Krebs per ottenere una soluzione madre  $10^{-3}$  M dalla quale sono state effettuate le successive diluizioni in Krebs.

- c. Ang-II (*Angiotensina II umana*, Sigma-Aldrich). Dalla soluzione madre 100  $\mu\text{M}$  sono state effettuate le successive diluizioni in Krebs.
- d. L-NAME (*L-nitro-arginina estere metilico cloridrato*, Sigma-Aldrich). La polvere è stata solubilizzata in Krebs per ottenere una madre  $10^{-2}$  M somministrata direttamente nel bagno per ottenere una concentrazione 100  $\mu\text{M}$ .
- e. ODQ (*1H-[1,2,4]oxadiazolo[4-3-a]quinoxalin-1-one*, Sigma-Aldrich). La polvere è stata solubilizzata in etanolo per ottenere una soluzione madre  $10^{-2}$  M dalla quale sono state ottenute le successive diluizioni in Krebs.
- f. PAG (DL-Propargilglicina, Sigma-Aldrich). La polvere è stata solubilizzata in Krebs per ottenere una madre  $10^{-1}$  M somministrata direttamente nel bagno per ottenere una concentrazione 1 mM.

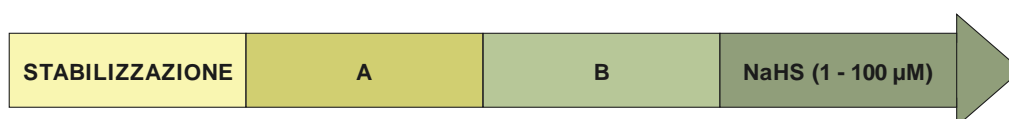
### 3.5. Protocolli sperimentali.

Terminato l'allestimento dell'organo si ha un periodo di stabilizzazione di 30 minuti durante il quale il cuore viene perfuso solo da soluzione di Krebs. Quando il perfusato raggiunge un flusso costante (ml/min) si può procedere con

l'esperimento seguendo il protocollo di interesse. Le sostanze studiate sono state somministrate in perfusione tramite medicazione della soluzione di Krebs. Durante tutto l'esperimento il perfusato è stato raccolto ogni 5 minuti, per un totale di circa 20 minuti di raccolta per ogni trattamento farmacologico effettuato. Quando la procedura sperimentale lo richiedeva sono state realizzate delle curve concentrazione/risposta della sostanza in esame. Alla fine dell'esperimento il cuore è stato accuratamente toelettato, asciugato e pesato.

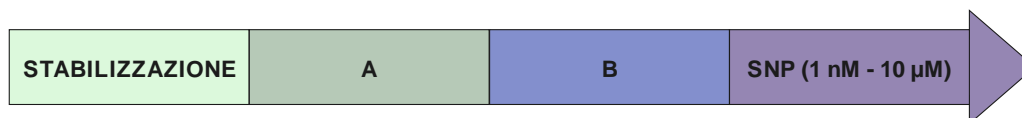
Tutti i protocolli sono stati svolti sia su ratti Wistar SHR sia sui ratti Wistar normotesi.

a. NaHS (1 - 100  $\mu$ M)



Gruppo	A	B
1	Veicolo	Veicolo
2	L-NAME (100 $\mu$ M)	Veicolo
3	ODQ (10 $\mu$ M)	Veicolo
4	Veicolo	Ang-II (0.1 $\mu$ M)
5	L-NAME (100 $\mu$ M)	Ang-II (0.1 $\mu$ M)
6	ODQ (10 $\mu$ M)	Ang-II (0.1 $\mu$ M)

b. SNP (1 nM - 10  $\mu$ M)



Gruppo	A	B
7	Veicolo	Veicolo
8	PAG (1 mM)	Veicolo
9	Veicolo	Ang-II (0.1 $\mu$ M)
10	PAG (1 mM)	Ang-II (0.1 $\mu$ M)

### 3.6. Analisi dei dati.

Il flusso coronarico (CF), registrato alla fine della stabilizzazione, è stato calcolato come ml/min/g di peso di cuore ed il dato ricavato è stato preso come valore basale. Cambiamenti del CF, in conseguenza al trattamento farmacologico, sono stati espressi in percentuale rispetto al flusso basale. I dati sono stati espressi come *mean*±*SEM*. Le analisi statistiche sono state effettuate da *ttest di student*.  $P < 0.05$  è stato preso in considerazione come indicatore di differenza significativa.

## 4. Risultati e discussione.

### 4.1. Coinvolgimento di NO endogeno negli effetti vascolari di NaHS sulle arterie coronarie di ratti normotesi.

Alla fine della stabilizzazione, i cuori isolati di ratti normotesi hanno mostrato un flusso coronarico (CF) basale di  $13.4 \pm 2.7$  ml/min/g (n=60). Concentrazioni cumulative crescenti di NaHS (1 - 100  $\mu$ M) hanno provocato vasorilasciamento delle arterie coronarie, confermato da un incremento del CF concentrazione-dipendente, fino ad un valore massimo del 126%. La perfusione con L-NAME (100  $\mu$ M), inibitore delle NOS, è stata associata ad una marcata e significativa riduzione del CF (66%). L'ODQ (10  $\mu$ M), inibitore della guanilato ciclastasi, non ha avuto effetti sul CF. In presenza di L-NAME o ODQ, NaHS ha quasi completamente perso il suo effetto rilasciante sulle arterie coronarie (Figura 1, Figura 5).

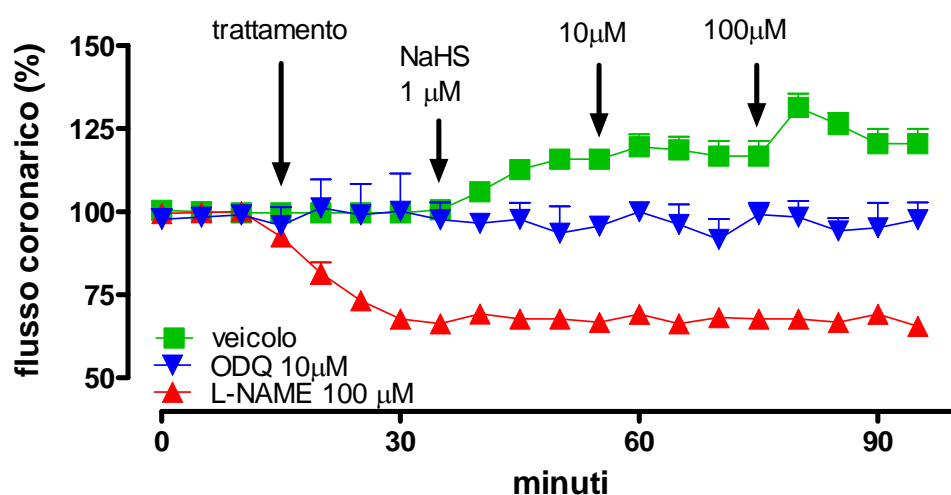


Figura 1. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti normotesi in seguito a perfusione con NaHS (1 - 100 µM) in assenza ed in presenza di inibitori della via NO/cGMP (L-NAME ed ODQ).

	Fase A	Fase C		
	Trattamento	NaHS 1 µM	NaHS 10 µM	NaHS 100 µM
Veicolo	100±1	116±3***	119±4***	126±3***
L-NAME	66±1###	68±3	68±2	69±1
ODQ	98±5	98±5	100±3	99±5

Tabella 1. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 1.

La perfusione con AngII (0.1 µM) ha prodotto una marcata e significativa riduzione del CF (66%). L'esposizione a dosi cumulative crescenti di NaHS (1-100 µM), sotto la continua presenza di AngII, ha promosso il vasorilasciamento



coronarico, indicato dal quasi completo recupero del flusso basale (indotto da NaHS già alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ ) ed un ulteriore incremento indotto da NaHS 100  $\mu\text{M}$  (fino al 131%). Nella perfusione con L-NAME, l'aggiunta di AngII ha manifestato una riduzione additiva del CF, 62% e 44% rispettivamente. Allo stesso modo, nella perfusione con ODQ, l'aggiunta di AngII ha causato la riduzione additiva del CF (90% e 56% rispettivamente). Comunque, la presenza di questi due inibitori del pathway dell'NO hanno quasi completamente inibito gli effetti vasorilascianti dell'NaHS nei vasi coronarici contratti con angiotensina (Figura 2, Figura 5).

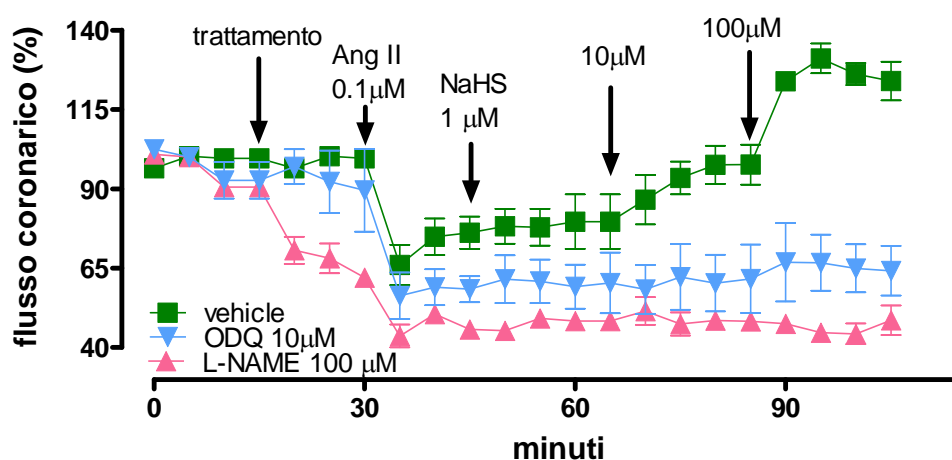


Figura 2. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti normotesi in seguito a perfusione con NaHS (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) in assenza ed in presenza di inibitori della via NO/cGMP (L-NAME ed ODQ), in arterie precontratte con AngII 0.1  $\mu\text{M}$ .

	Fase A	Fase B	Fase C		
	Trattamento	AngII	NaHS 1 $\mu$ M	NaHS 10 $\mu$ M	NaHS 100 $\mu$ M
Veicolo	100 $\pm$ 4	66 $\pm$ 6***	78 $\pm$ 6	98 $\pm$ 6 <sup>\$\$</sup>	131 $\pm$ 5 <sup>\$\$\$</sup>
L-NAME	62 $\pm$ 1###	44 $\pm$ 4***	49 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3
ODQ	90 $\pm$ 13	56 $\pm$ 7*	61 $\pm$ 7	62 $\pm$ 10	67 $\pm$ 9

Tabella 2. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 2.

#### 4.2. Coinvolgimento di NO endogeno negli effetti vascolari di NaHS sulle arterie coronarie di ratti ipertesi.

Alla fine della stabilizzazione, i cuori isolati di ratti SHR hanno manifestato un CF basale di 11.0 $\pm$ 1.8 ml/min/g (n=60). Il CF basale dei ratti SHR non ha differito significativamente da quello registrato sui normotesi. Concentrazioni cumulative crescenti di NaHS (1 - 100  $\mu$ M) hanno promosso il vasorilasciamento delle arterie coronarie fino ad un valore massimo del 124%. Questi effetti sono qualitativamente e quantitativamente equivalenti a quelli indotti su ratti normotesi. La perfusione con L-NAME (100  $\mu$ M) o ODQ (10  $\mu$ M) non ha provocato significative riduzioni del CF. L'ODQ non ha modificato gli effetti dell'NaHS. In contrasto, L-NAME ha inibito significativamente gli effetti dell'NaHS 1 e 10  $\mu$ M; tuttavia la massima concentrazione di

NaHS ( $100 \mu\text{M}$ ) ha comunque indotto un significativo incremento (circa 110%) sul CF, riportandolo quasi completamente ai livelli basali (Figura 3, Figura 5).

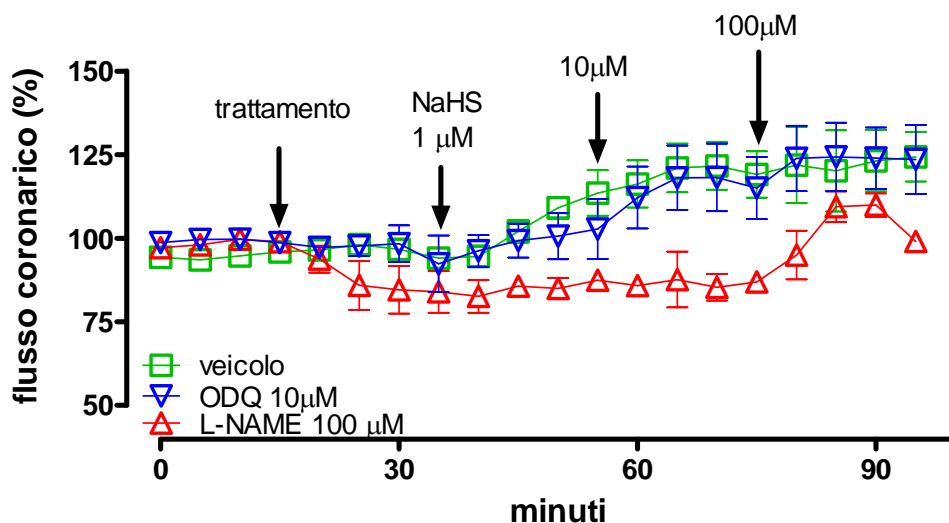


Figura 3. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti ipertesi (SHR) in seguito a perfusione con NaHS (1 -  $100 \mu\text{M}$ ) in assenza ed in presenza di inibitori della via NO/cGMP (L-NAME ed ODQ).

	Fase A	Fase C		
	Trattamento	NaHS $1 \mu\text{M}$	NaHS $10 \mu\text{M}$	NaHS $100 \mu\text{M}$
Veicolo	97±1	114±7*	122±7**	124±7**
L-NAME	84±6 <sup>##</sup>	87±2	88±8	110±4**
ODQ	92±8	103±9	118±10	124±10*

Tabella 3. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 3.

La perfusione dei cuori di ratti SHR con AngII ( $0.1 \mu\text{M}$ ) ha causato una marcata e significativa riduzione del CF (66%). Questo effetto inibitorio è equivalente a quello registrato su ratti normotesi. In presenza di AngII, solo la maggiore concentrazione di NaHS ( $100 \mu\text{M}$ ) ha causato un incremento apprezzabile del CF. Dopo perfusione con L-NAME, l'aggiunta di AngII ha provocato una diminuzione additiva del CF (78% e 65% rispettivamente). Analogamente, dopo perfusione con ODQ, l'aggiunta di AngII ha prodotto una riduzione additiva del CF (87% e 76% rispettivamente). Comunque, entrambi gli inibitori del pathway dell'NO non hanno influenzato gli effetti vasorilascianti provocati dalla massima concentrazione di NaHS ( $100 \mu\text{M}$ ) nelle arterie coronarie contratte con angiotensina (Figura 4, Figura 5).

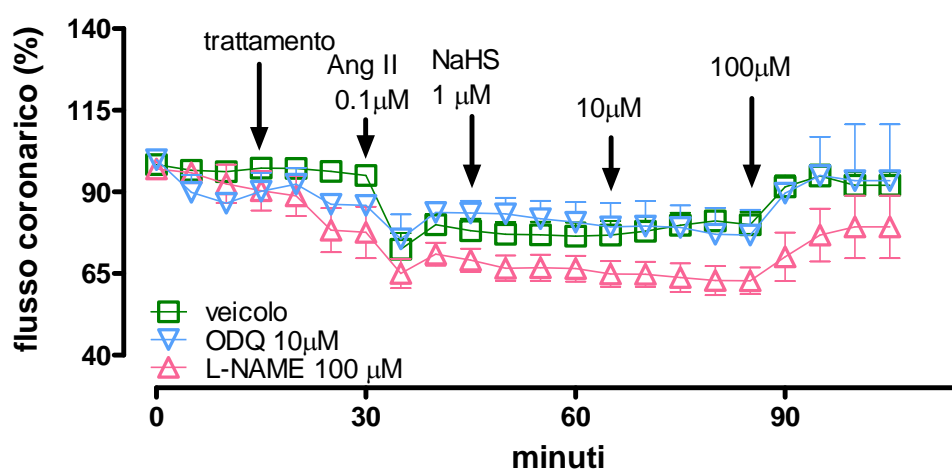


Figura 4. Curva “time-course” che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti ipertesi (SHR) in seguito a perfusione con NaHS (1 - 100  $\mu$ M) in assenza ed in presenza di inibitori della via NO/cGMP (L-NAME ed ODQ), in arterie coronarie precontratte con AngII 0.1  $\mu$ M.

	Fase A	Fase B	Fase C		
	Trattamento	AngII	NaHS 1 $\mu$ M	NaHS 10 $\mu$ M	NaHS 100 $\mu$ M
Veicolo	98 $\pm$ 1	66 $\pm$ 4***	70 $\pm$ 7	71 $\pm$ 8	86 $\pm$ 6 <sup>\$</sup>
L-NAME	92 $\pm$ 6	65 $\pm$ 3***	67 $\pm$ 4	64 $\pm$ 4	77 $\pm$ 6 <sup>\$</sup>
ODQ	87 $\pm$ 3 <sup>#</sup>	76 $\pm$ 5	82 $\pm$ 5	79 $\pm$ 7	98 $\pm$ 9 <sup>\$</sup>

Tabella 4. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 4.

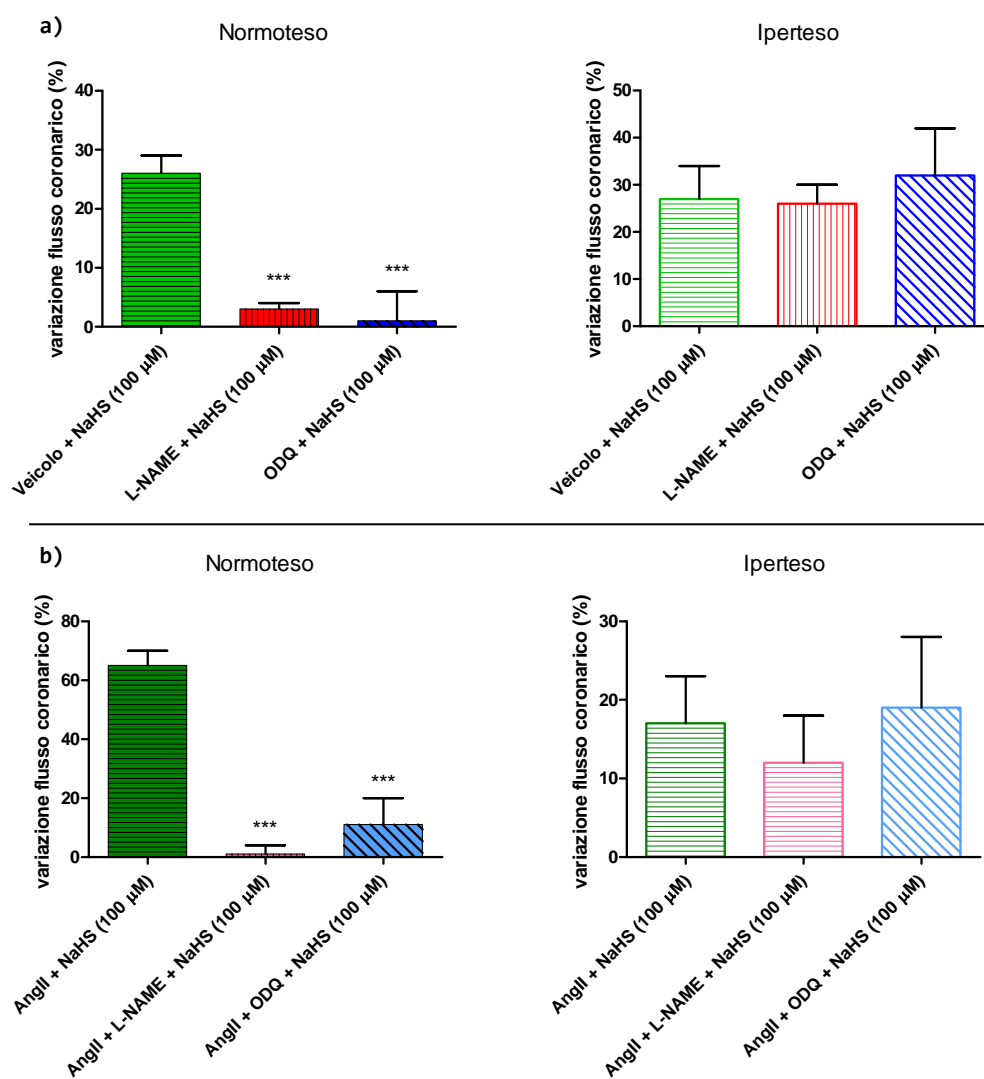


Figura 5. Variazione del flusso coronarico alla concentrazione massima di NaHS (100  $\mu$ M) in assenza ed presenza di inibitori della via NO/cGMP (L-NAME ed ODQ), in arterie coronarie normali (a) ed in arterie coronarie precontratte con AngII 0.1  $\mu$ M (b).

#### 4.3. Coinvolgimento di H<sub>2</sub>S endogeno negli effetti vascolari di SNP sulle arterie coronarie di ratti normotesi.

Concentrazioni cumulative crescenti di SNP (1 nM - 10  $\mu$ M) hanno promosso l'incremento del CF in modo concentrazione-dipendente, fino al valore massimo del 132%. La perfusione con PAG (1 mM), inibitore della biosintesi dell'H<sub>2</sub>S, non ha alterato significativamente il CF basale. In presenza di PAG, gli effetti di SNP sono stati completamente aboliti (Figura 6, Figura 10).

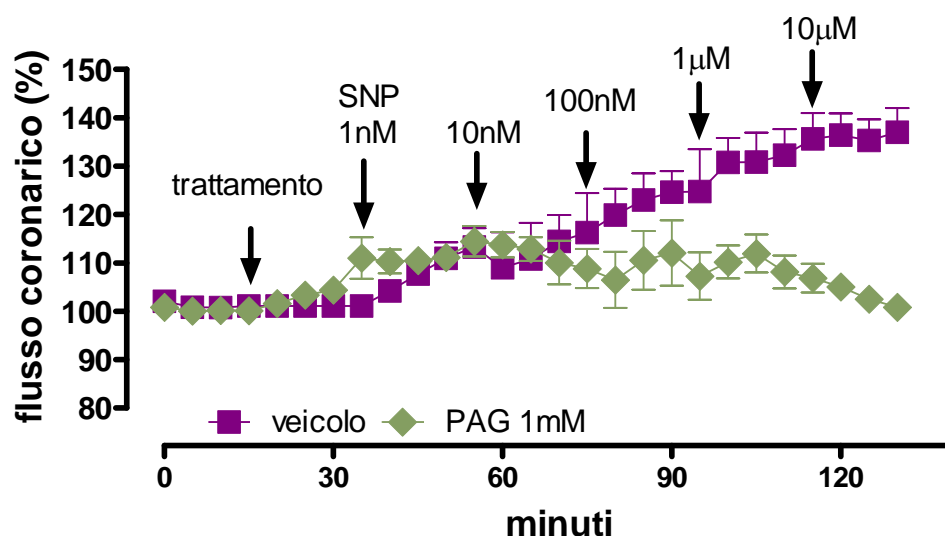


Figura 6. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti normotesi in seguito a perfusione con SNP (1 nM - 10  $\mu$ M) in assenza ed in presenza di inibitore della biosintesi di H<sub>2</sub>S (PAG).

	Fase A	Fase C				
	Trattamento	SNP 1 nM	SNP 10 nM	SNP 100 nM	SNP 1 $\mu$ M	SNP 10 $\mu$ M
Veicolo	101 $\pm$ 2	111 $\pm$ 3	116 $\pm$ 8	125 $\pm$ 4***	125 $\pm$ 4***	132 $\pm$ 5***
PAG	111 $\pm$ 7	115 $\pm$ 5	109 $\pm$ 7	107 $\pm$ 8	107 $\pm$ 5	101 $\pm$ 3

Tabella 6. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 6.

La perfusione con AngII (0.1  $\mu$ M) ha causato una marcata e significativa diminuzione del CF (69%). Sotto la continua presenza di AngII, la perfusione di SNP (1 nM – 10  $\mu$ M) ha indotto un incremento del CF concentrazione-dipendente (fino al 166%). In presenza di PAG, la perfusione "add-on" con AngII ha diminuito il CF (79%). La presenza di PAG ha inibito marcatamente e significativamente l'effetto vasorilasciante del SNP in arterie coronarie contratte da angiotensina (Figura 7, Figura 10).



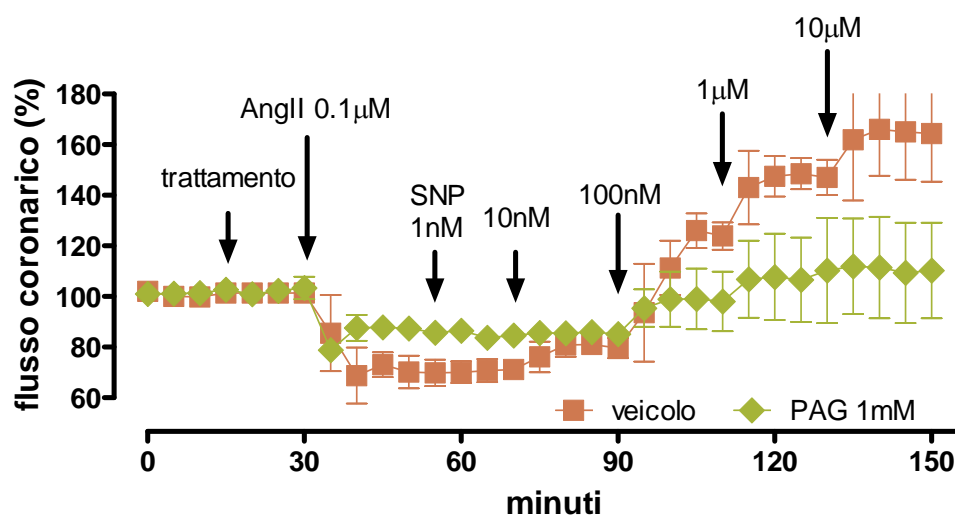


Figura 7. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti normotesi in seguito a perfusione con SNP (1 nM - 10 µM) in assenza ed in presenza di inibitore della biosintesi di H<sub>2</sub>S (PAG) in arterie coronarie precontratte con AngII 0.1 µM.

	Fase A	Fase B	Fase C				
	Tratta- mento	AngII	SNP 1 nM	SNP 10 nM	SNP 100 nM	SNP 1 µM	SNP 10 µM
Veicolo	101±1	69±11**	71±5	81±4	126±7 <sup>\$\$\$</sup>	149±6 <sup>\$\$\$</sup>	166±18 <sup>\$\$\$</sup>
PAG	103±4	79±1***	84±1 <sup>\$\$</sup>	86±1 <sup>\$\$</sup>	99±12	108±17	112±19

Tabella 7. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 7.

#### 4.4. Coinvolgimento di H<sub>2</sub>S endogeno negli effetti vascolari di SNP sulle arterie coronarie di ratti ipertesi.

Concentrazioni cumulative crescenti di SNP (1 nM - 10  $\mu$ M) hanno promosso l'incremento del CF in modo concentrazione-dipendente, fino al valore massimo del 133%. La perfusione con PAG (1 mM) non ha alterato significativamente il CF basale (92%). Il PAG ha attenuato (ma non abolito) l'effetto del SNP (Figura 8, Figura 10).

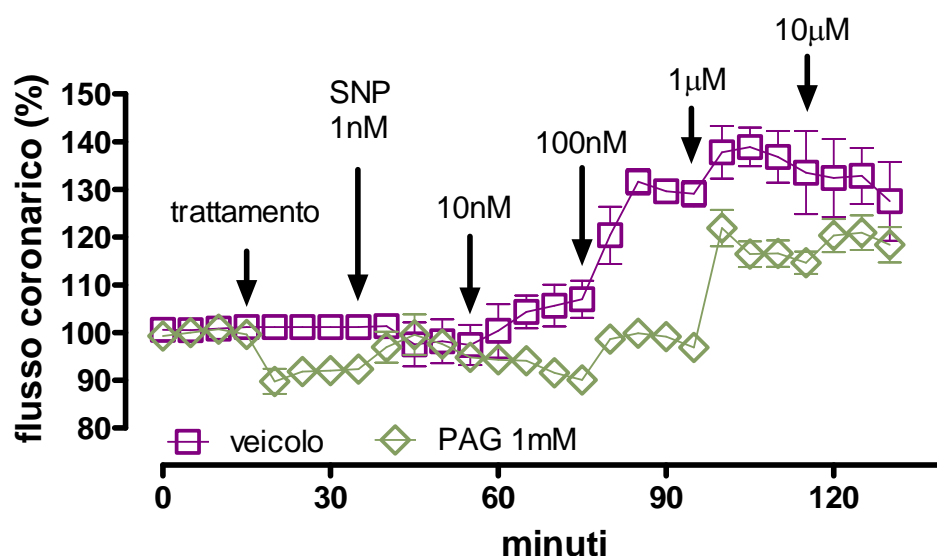


Figura 8. Curva "time-course" che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti ipertesi (SHR) in seguito a perfusione con SNP (1 nM - 10  $\mu$ M) in assenza ed in presenza di inibitore della biosintesi di H<sub>2</sub>S (PAG).

	Fase A	Fase C				
	Trattamento	SNP 1 nM	SNP 10 nM	SNP 100 nM	SNP 1 $\mu$ M	SNP 10 $\mu$ M
Veicolo	101 $\pm$ 4	97 $\pm$ 4	104 $\pm$ 4	130 $\pm$ 2***	139 $\pm$ 4***	133 $\pm$ 6***
PAG	92 $\pm$ 2	100 $\pm$ 4	94 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1**	117 $\pm$ 3***	121 $\pm$ 4***

*Tabella 8. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 8.*

La perfusione con AngII (0.1  $\mu$ M) ha causato una marcata e significativa diminuzione del CF (77%). Il SNP (1 nM - 10  $\mu$ M), sotto la continua presenza di AngII, ha promosso un incremento concentrazione-dipendente del CF (fino al 125%). In presenza di PAG, la perfusione "add-on" con AngII ha diminuito il CF (64%). La presenza di PAG ha ridotto (ma non abolito) gli effetti di SNP sui vasi coronarici contratti con angiotensina (Figura 9, Figura 10).

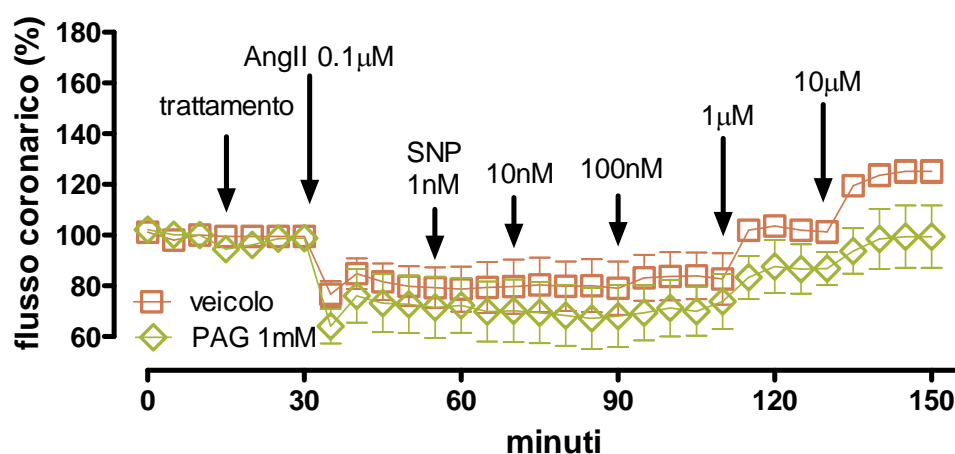


Figura 9. Curva “time-course” che mostra la variazione del flusso coronarico (%) su ratti ipertesi (SHR) in seguito a perfusione con SNP (1 nM - 10 µM) in assenza ed in presenza di inibitore della biosintesi di H<sub>2</sub>S (PAG) in arterie coronarie precontratte con AngII 0.1 µM.

	Fase A	Fase B	Fase C				
	Tratta- mento	AngII	SNP 1 nM	SNP 10 nM	SNP 100 nM	SNP 1 µM	SNP 10 µM
Veicolo	100±1	75±5***	80±11	80±11	84±9	104±4\$\$\$	125±5\$\$\$
PAG	99±4	64±7***	70±12	69±12	71±11	88±10\$	99±12\$

Tabella 9. Dati che si riferiscono alla variazione massima del flusso coronarico (%) riguardo il protocollo della Figura 9.

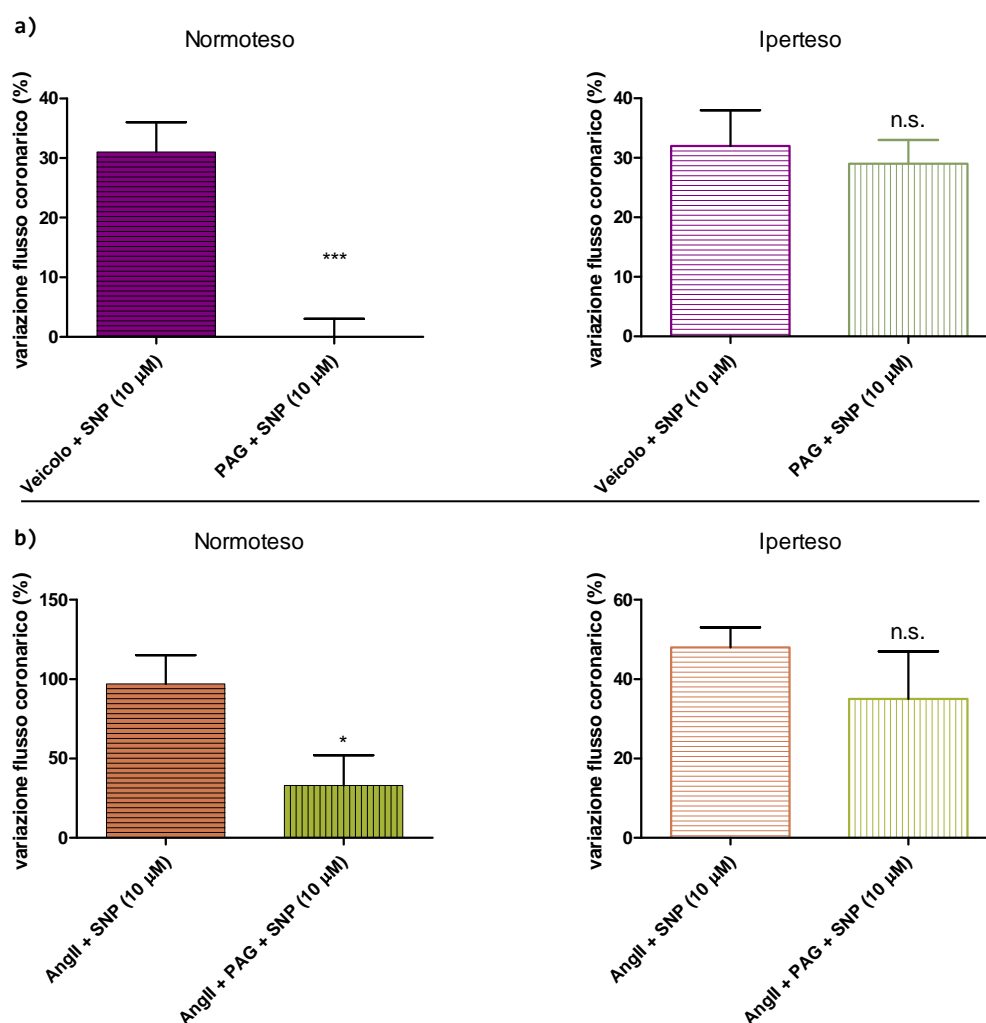


Figura 10. Variazione del flusso coronarico alla concentrazione massima di SNP (10  $\mu$ M) in assenza ed presenza di inibitore della biosintesi di  $H_2S$  (PAG), in arterie coronarie normali (a) ed in arterie coronarie precontratte con AngII 0.1  $\mu$ M (b).

Legenda tabelle:

\*Differente statisticamente dal valore corrispondente registrato in Fase A (\*= $P<0.05$ ; \*\*= $P<0.01$ ; \*\*\*= $P<0.001$ ).

<sup>§</sup>Differente statisticamente dal valore corrispondente registrato in Fase B (<sup>§</sup>= $P<0.05$ ; <sup>§§</sup>= $P<0.01$ ; <sup>§§§</sup>= $P<0.001$ ).

<sup>#</sup>Differente statisticamente dal valore corrispondente registrato sul basale (<sup>#</sup>= $P<0.05$ ; <sup>##</sup>= $P<0.01$ ; <sup>###</sup>= $P<0.001$ ).

#### 4.5. Discussione.

Il pathway dell' $\text{H}_2\text{S}$  è essenziale nella regolazione dell'omeostasi circolatoria, attraverso una serie di differenti meccanismi e siti d'azione. Tra questi, l'effetto vasorilasciante di questo gas trasmettitore gioca probabilmente un ruolo fondamentale per la regolazione omeostatica di specifici letti vascolari, come le arterie coronarie (Martelli et al., 2012). Coerentemente con questa visione, in questa tesi, l'NaHS (donatore esogeno di  $\text{H}_2\text{S}$ ) ha provocato incrementi basali concentrazione-dipendenti del flusso coronarico. È da notare che questi effetti sono simili in ratti normotesi e spontaneamente ipertesi. Ugualmente, l'AngII suscita la stessa risposta di vasocostrizione nel letto coronarico di ratti normotesi e SHR, come indicato dal livello equivalente di riduzione del CF AngII-indotto in entrambi i gruppi sperimentali. In conseguenza alla vasocostrizione indotta da AngII, l'effetto rilasciante dell'NaHS, ancora presente nei vasi dei normotesi, è significativamente ridotto (sebbene non abolito) nei vasi dei ratti SHR.

La perfusione con L-NAME, inibitore della NO-sintetasi, è associata ad una notevole costrizione delle arterie coronarie dei ratti normotesi, testimoniato da un drastico

calo del CF, indicando un rilevante contributo dell'NO endoteliale nella modulazione del tono della muscolatura liscia coronarica. Tuttavia, l'ODQ, inibitore della guanilato ciclastasi, ha causato una riduzione trascurabile del CF. I due differenti effetti indotti da L-NAME e ODQ sono probabile conseguenza dello specifico meccanismo d'azione dei due inibitori: infatti, sebbene cGMP sia il principale effettore della risposta rilasciante di NO, è ampiamente accettata la presenza di pathway secondari cGMP-indipendenti (Wanstall et al., 2005). Pertanto, L-NAME (inibitore della biosintesi di NO) può effettivamente inibire tutte le vie vasodilatatorie attivate dall'NO, mentre ODQ (inibitore solamente della guanilato ciclastasi), può solo parzialmente inibire le vie mediate dall'NO.

È interessante invece osservare che pretrattamenti con L-NAME o ODQ di vasi coronarici di ratti normotesi portano ad una completa abolizione dell'effetto coronarodilatatore di NaHS. L'effetto dell'NaHS è stato completamente abolito da L-NAME e ODQ anche in vasi di ratti normotesi contratti da angiotensina.

Questi risultati indicano che, in condizioni normali, l'azione rilasciante dell'H<sub>2</sub>S sui vasi coronarici è strettamente dipendente dal rilascio endogeno di NO.

Nei cuori provenienti dai ratti SHR, il CF basale è simile a quello misurato sui normotesi. Tuttavia, il decremento di CF indotto da L-NAME, sebbene significativamente evidente, è risultato marcatamente inferiore rispetto a quello registrato sui normotesi, confermando che l'NO endoteliale endogeno contribuisce solo in parte alla modulazione del tono vasomotore nella muscolatura liscia coronarica dei ratti SHR (Moltzer et al., 2010).

È degno di nota che l'influenza dell'L-NAME e dell'ODQ sugli effetti dilatatori esercitati da NaHS nelle arterie coronarie di ratti SHR è significativamente differente da quella osservata su vasi di animali normotesi. Infatti, l'ODQ non è riuscito ad incidere sul rilasciamento indotto da NaHS; mentre l'L-NAME, che nei normotesi riesce ad abolire completamente l'effetto vasorilasciante, negli SHR attenua solo in parte tale effetto. Queste scoperte indicano la presenza di una componente alternativa, che agisce come una via compensatoria mantenendo l'effetto vasodilatatorio dell'H<sub>2</sub>S nelle arterie coronarie degli animali ipertesi in caso di una ridotta disponibilità di NO.

Pertanto nelle arterie coronarie di ratti normotesi, l'effetto vasorilasciante indotto da H<sub>2</sub>S richiede obbligatoriamente una via funzionale NO/cGMP. Al contrario,



in caso di ipertensione, l'azione vasorilasciante dell'H<sub>2</sub>S sui vasi coronarici sembra scarsamente dipendente dal rilascio di NO.

Il SNP (donatore esogeno di NO) ha provocato un incremento concentrazione-dipendente del CF basale, sia nei ratti normotesi che in quelli spontaneamente ipertesi. In conseguenza a vasospasmo dei vasi coronarici di ratti normotesi, dovuto alla somministrazione di AngII, il SNP ha continuato a produrre un effetto vasorilasciante. In contrasto, l'effetto di SNP su vasi di ratti SHR contratti con AngII è stato significativamente ridotto. La perfusione con PAG (inibitore della CSE) ha determinato una diminuzione modesta (e non significativa) del CF nei cuori provenienti da ratti SHR, mentre non ha avuto nessun effetto sulle arterie coronarie dei normotesi. Questa osservazione potrebbe indicare l'esistenza di una piccola differenza nel ruolo modulatore dell'H<sub>2</sub>S endogeno, ma questa ipotesi dovrà essere valutata in studi più specifici. Il pretrattamento di vasi coronarici normotesi con PAG porta ad una quasi completa abolizione degli effetti del SNP sul CF basale. Al contrario, il PAG ha un'influenza molto modesta sugli effetti del SNP sul letto coronarico di ratti SHR. Analogamente, in vasi normotesi contratti con AngII, gli effetti rilascianti del SNP sono stati fortemente inibiti

dal PAG; mentre, nelle arterie coronarie contratte con AngII dei ratti SHR, gli effetti vasodilatatori sono stati scarsamente influenzati dagli inibitori delle CSE. Perciò, i risultati degli esperimenti condotti con SNP e PAG hanno sottolineato che, in condizioni normali, il controllo positivo del pathway dell'NO sul CF è significativamente mediato dalla produzione e dal rilascio dell'H<sub>2</sub>S endogeno, e che, in condizioni di ipertensione, tale dipendenza dall'H<sub>2</sub>S si attenua in modo significativo. Quindi, una forte e speculare analogia tra NaHS e SNP è stata chiaramente osservata: in condizioni normali, l'effetto vasoattivo di NO richiede obbligatoriamente il pathway CSE/H<sub>2</sub>S; mentre, in condizioni di ipertensione, l'effetto coronarodilatatorio dell'NO è in gran parte H<sub>2</sub>S-indipendente.

#### 4.6. Conclusioni.

Questi risultati dimostrano, per la prima volta, l'esistenza di una differente interazione tra H<sub>2</sub>S ed NO nelle arterie coronarie di ratti normotesi e spontaneamente ipertesi. In particolare, in condizioni normali, l'azione rilasciante sulle coronarie prodotta da H<sub>2</sub>S sembra richiedere obbligatoriamente NO e, vice versa, l'effetto dilatatorio di NO necessita di H<sub>2</sub>S. Sulla base di studi precedenti, che

hanno descritto l'inibizione della 5-fosfodiesterasi mediata da H<sub>2</sub>S nella muscolatura liscia vasale (Bucci et al., 2010), può essere ipotizzato che, in condizioni normali, H<sub>2</sub>S ed NO possono interagire mutualmente portando all'accumulo di cGMP. Tale affermazione è in accordo con altri lavori, che dimostrano che l'H<sub>2</sub>S endogeno è essenziale per la produzione di cGMP NO-mediata e che la soppressione delle CSE abolisce l'accumulo di cGMP NO-indotto (Coletta et al., 2012). Invece, l'interazione reciproca tra i pathway di NO ed H<sub>2</sub>S nei ratti SHR sembra essere meno vincolata. Questo può indicare che lo stato ipertensivo porti a smascherare (oppure a rafforzare) meccanismi accessori NO-indipendenti per H<sub>2</sub>S, e meccanismi accessori H<sub>2</sub>S-indipendenti per NO. Complessivamente, questi dati rappresentano un primo passo per capire la complessa interazione NO/H<sub>2</sub>S in condizioni normali ed in presenza di stati patologici cardiovascolari.

## 5. Bibliografia.

- ~ Abe K, Kimura H. *The possible role of hydrogen sulphide as an endogenous neuromodulator.* J. Neurosci. 1996; 16: 1066-1071.
- ~ Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. *Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide?* Br J Pharmacol. 2006; 149: 625-634.
- ~ Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. *The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo.* J Biol Chem. 1998; 273: 32950-32956.
- ~ Ashcroft SJ, Ashcroft FM. *Properties and functions of ATP-sensitive K-channels.* Cell Signal. 1990; 2: 197-214.
- ~ Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK. *Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes.* J Pharmacol Exp Ther. 2006; 316: 670-678.
- ~ Bliksøen M, Kaljusto ML, Vaage J, Stensløkken KO. *Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion*

- injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart. Eur J Cardiothorac Surg. 2008; 34: 344-349.*
- ~ Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V, De Gruttola L, Bucci M, Cirino G. *Biosynthesis of H<sub>2</sub>S in impaired in obese diabetic (NOD) mice. Br. J. Pharmacol. 2008; 155: 673-680.*
- ~ Bryan NS, Bian K, Murad F. *Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. Front Biosci. 2009; 14: 1-18.*
- ~ Bucci M, Cirino G. *Hydrogen sulphide in heart and systemic circulation. Inflamm Allergy Drug Targets. 2011; 10: 103-108.*
- ~ Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Rosussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G. *Hydrogen sulphide in an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. ATVB 2010; 30: 1998-2004.*
- ~ Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. *Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. Nat. Rev. Neurosci. 2007; 8: 766-775.*
- ~ Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C. *Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. Amino Acids. 2008; 34: 573-585.*

- ~ Cheang WS, Wong WT, Shen B, Lau CW, Tian XY, Tsang SY, Yao X, Chen ZY, Huang Y. *4-aminopyridine-sensitive K<sup>+</sup> channels contributes to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery*. *Vascul Pharmacol*. 2010; 53: 94-98.
- ~ Chen X, Jhee KH, Kruger WD. *Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine*. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 52082-52086.
- ~ Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. *Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 2316-2323.
- ~ Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. *Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 9161-9166.
- ~ Dombkowski RA, Russell MJ, Schulman AA, Doellman MM, Olson KR. *Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: R243-252.

- ~ Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. *Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa.* Biochem Pharmacol. 2001; 62: 255-259.
- ~ Gautier M, Hyvelin JM, de Crescenzo V, Eder V, Bonnet P. *Heterogeneous Kv1 function and expression in coronary myocytes from right and left ventricles in rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 292: H475-482.
- ~ Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. *Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol.* Biochem Biophys Res Commun. 2004; 318: 756-763.
- ~ Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C. *H<sub>2</sub>S generated by heart in rat and its effects on cardiac function.* Biochem Biophys Res Commun. 2004a; 313: 362-368.
- ~ Gubern M, Andriamihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F. *Sulfide, the first inorganic substrate for human cells.* FASEB J. 2007; 21: 1699-1706.
- ~ Han J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE. *ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 283: H1545-1554.

- ~ Hildebrandt TM, Grieshaber MK. *Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria.* FEBS J. 2008; 275: 3352-3361.
- ~ Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide.* Biochem Biophys Res Commun. 1997; 237: 527-531.
- ~ Ignarro LJ. *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology.* Biosci Rep. 1999; 19: 51-71.
- ~ Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. *Molecular mechanism for H<sub>2</sub>S-induced activation of K<sub>ATP</sub> channels.* Antioxid Redox Signal. 2010; 12: 1167-1178.
- ~ Kiss L, Deitch EA, Szabó C. *Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition.* Life Sci. 2008; 83: 589-594.
- ~ Kloner RA, Giacomelli F, Alker KJ, Hale SL, Matthews R, Bellows S. *Influx of neutrophils into the walls of large epicardial coronary arteries in response to ischemia/reperfusion.* Circulation. 1991; 84: 1758-1772.
- ~ Köhn C, Schleifenbaum J, Szijártó IA, Markó L, Dubrovská G, Huang Y, Gollasch M. *Differential effects of*



- cystathionine-γ-lyase-dependent vasodilatory H<sub>2</sub>S in periadventitial vasoregulation of rat and mouse aortas.* PLoS One. 2012; 7: e41951.
- ~ Kurzban GP, Chu L, Ebersole JL, Holt SC. *Sulphemoglobin formation in human erythrocytes by cystalysin, an L-cysteine desulfhydrase from Treponema denticola.* Oral Microbiol Immunol. 1999; 14: 153-164.
- ~ Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner MK, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S. *The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells.* J Hypertens. 2007; 25: 2100-2104.
- ~ Li L, Hsu A, Moore PK. *Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation: a tale of three gases.* Pharmacol. Ther. 2009; 123: 386-400.
- ~ Li L, Moore PK. *Purative biological roles of hydrogen sulphide in health and disease: A breath of not so fresh air?* Trends. Pharmacol. 2008; 29: 84-90.
- ~ Liu Y, Terata K, Rusch NJ, Gutterman DD. *High glucose impairs voltage-gated K<sup>+</sup> channel current in rat small coronary arteries.* Circ Res. 2001; 89: 146-152.

- ~ Lowicka E, Beltowski J. *Hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S): The third gas of interest for pharmacologists*. Pharmacol. Rep. 2007; 59: 4-24.
- ~ Mackie AR, Brueggemann LI, Henderson KK, Shiels AJ, Cribbs LL, Scrogin KE, Byron KL. *Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance*. J Pharmacol Exp Ther. 2008; 325: 475-483.
- ~ Mani BK, Byron KL. *Vascular KCNQ channels in humans: the sub-threshold brake that regulates vascular tone?* Br J Pharmacol. 2011; 162: 38-41.
- ~ Martelli A, Testai L, Breschi MC, Blandizzi C, Virdis A, Taddei S, Calderone V. *Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery*. 2012; 32: 1093-1130.
- ~ Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Taglialatela M, Calderone V. *Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels*. Pharmacol Res. 2013; 70: 27-34.
- ~ Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Taglialatela M, Calderone V. *Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels*. Pharmacol Res. 2013; 70: 27-34.

- ~ Mok YY, Atan MS, Yoke PC, Zhong Jing W, Bhatia M, Moochhala S, Moore PK. *Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis*. Br. J. Pharmacol. 2004; 143: 881-889.
- ~ Moltzer E, Verkuil AV, van Veghel R, Danser AH, van Esch JH. *Effects of angiotensin metabolites in the coronary vascular bed of the spontaneously hypertensive rat: loss of angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation*. Hypertension 2010; 55: 516-522.
- ~ Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. *H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration*. Sci Signal. 2009; 2: ra72.
- ~ Ng FL, Davis AJ, Jepps TA, Harhun MI, Yeung SY, Wan A, Reddy M, Melville D, Nardi A, Khong TK, Greenwood IA. *Expression and function of the K<sup>+</sup> channel KCNQ genes in human arteries*. Br J Pharmacol. 2011; 162: 42-53.
- ~ Nichols CG. *K<sub>ATP</sub> channels as molecular sensors of cellular metabolism*. Nature. 2006; 440: 470-476.
- ~ Ohya S, Sergeant GP, Greenwood IA, Horowitz B. *Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current*. Circ Res. 2003; 92: 1016-1023.

- ~ Olson KR, Donald JA. *Nervous control of circulation: the role of gastransmitters, NO, CO and H<sub>2</sub>S*. Acta Histochem. 2009; 111: 244-256.
- ~ Ponderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riodo N, Schopfer F, Boveris A. *Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles*. Arch. Biophys. 1996; 328: 85-92.
- ~ Prockop LD, Chichkova RI. *Carbon monoxide intoxication: An update review*. J. Neurol. Sci. 2007; 262: 122-130.
- ~ Robbins J. *KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Ther. 2001; 90: 1-19.
- ~ Robert K, Vialard F, Thiery E, Toyama K, Sinet PM, Janel N, London J. *Expression of the cystathionine beta-synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain*. J Histochem Cytochem. 2003; 51: 363-371.
- ~ Roberts MJ, Young IS, Trouton TG, Trimble ER, Khan MM, Webb SW, Wilson CM, Patterson GC, Adgey AA. *Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty*. Lancet. 1990; 336: 143-145.
- ~ Sanderson K. *Hydrogen sulphide biology: Emissions control*. Nature. 2009; 459: 500-502.

- ~ Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, Dubrovskaya G, Zavarinskaya O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R, Gollasch M. *Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide.* J Hypertens. 2010; 28: 1875-1882.
- ~ Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C. *Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R.* Shock. 2009; 31: 267-274.
- ~ Soldovieri MV, Miceli F, Taglialatela M. *Driving with no brakes: molecular pathophysiology of Kv7 potassium channels.* Physiology. 2011; 26:365-376.
- ~ Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. *Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle.* Science. 1989; 245: 177-180.
- ~ Szabó C. *Hydrogen sulphide and its therapeutic potential.* Nat Rev Drug Discov. 2007; 6: 917-935.
- ~ Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. *Direct stimulation of K<sub>ATP</sub> channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells.* Mol Pharmacol. 2005; 68: 1757-1764.

- ~ Wanstall JC, Homer KL, Doggrell SA. *Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets.* Curr Vasc Pharmacol 2005; 3: 41-53.
- ~ Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Siau J-L, Cheung NS, Haillwell B, Moore PK. *The novel neuromodulator hydrogen sulphide: an endogenous peroxynitrite "scavenger"?* J.Neurochem. 2004; 90: 765-768.
- ~ Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau J-L, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK. *Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 326: 794-798.
- ~ Yan H, Du J, Tang C. *The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats.* Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313: 22-27.
- ~ Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. *H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase.* Science 2008; 322: 587-590.
- ~ Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J. *Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-*

- reperfusion injury by opening  $K_{ATP}$  channels. Can J Physiol Pharmacol. 2007; 85: 1248-1253.*
- ~ Zhao W, Ndisang JF, Wang R. *Modulation of endogenous production of  $H_2S$  in rat tissues. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2003; 81: 848-853.*
- ~ Zhao W, Wang R.  *$H_2S$  induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2002; 283: 474-480.*
- ~ Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. *The vasorelaxant effect of  $H_2S$  as a novel endogenous gaseous  $K_{ATP}$  channel opener. EMBO J. 2001; 20: 6008-6016.*
- ~ Zhong G, Chen F, Cheng Y, Tang C, Du J. *The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. J Hypertens. 2003; 21: 1879-1885.*
- ~ Zhong GZ, Li YB, Liu XL, Guo LS, Chen ML, Yang XC. *Hydrogen sulfide opens the  $K_{ATP}$  channel on rat atrial and ventricular myocytes. Cardiology. 2010; 115: 120-126.*

## 6. Ringraziamenti.

*Ringrazio i miei genitori e mio fratello Daniel per avermi supportato e spronato ad affrontare i momenti difficili di questo lungo percorso.*

*Ringrazio la mia fidanzata Nunzia per avermi sopportato durante questi otto anni, con la speranza di un futuro insieme.*

*Ringrazio il Prof. Calderone, la Dott.ssa Testai e la Dott.ssa Martelli che sono stati ottimi mentori: preparati, pazienti, sempre disponibili ed estremamente gentili nei miei riguardi.*

*Infine ringrazio tutte le persone che hanno creduto in me...*

*David Ferrara*



*Dedico la mia Laurea a coloro che hanno contribuito a rendermi la  
persona che sono oggi e che adesso, purtroppo, non ci sono più...*